PRÁCTICA : PROTEINAS

DETERMINACIÓN CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE PROTEINAS

II Semestre, 2025

TEC | Tecnológico de Costa Rica

Objetivo

Determinar por un método espectrofotométrico la concentración de proteínas en una solución

Reacción de Biuret

Determinación y cuantificación de péptidos y proteínas

Azul-Violeta

Verde de Bromocresol

Determinación y cuantificación de albúmina

Amarillo → **Celeste**

Reacción de Biuret

Determinación de proteínas

Péptidos

Proteínas

→ SÍ

Aminoácidos

Dipéptidos

→ NO

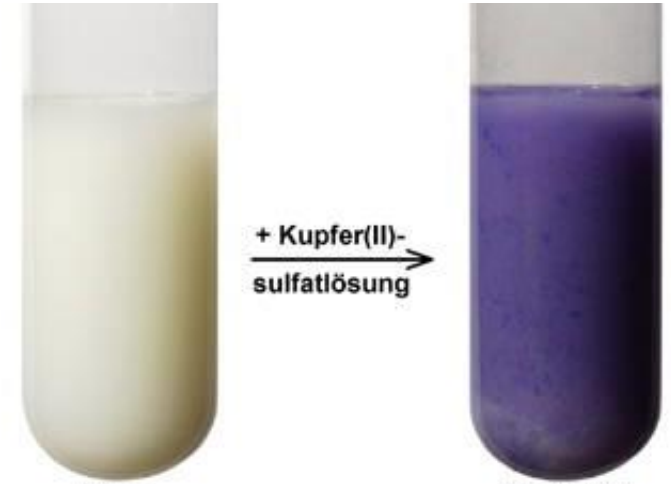
Iones Cu 2+ en solución alcalina forman un complejo con los pares electrónicos libres de los N de los grupos imino en el enlace peptídico

→ Quelato color violeta

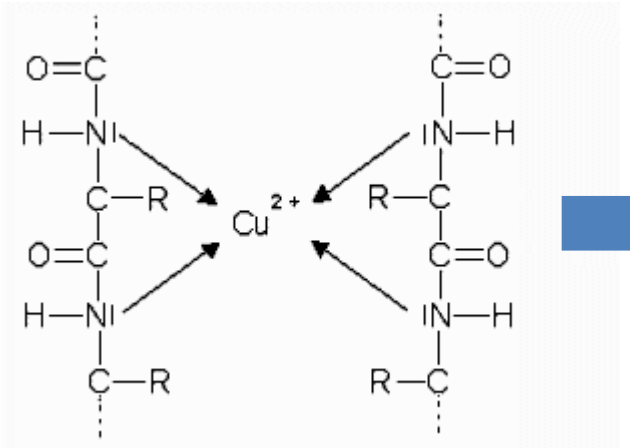
Máxima absorbancia a 540nm

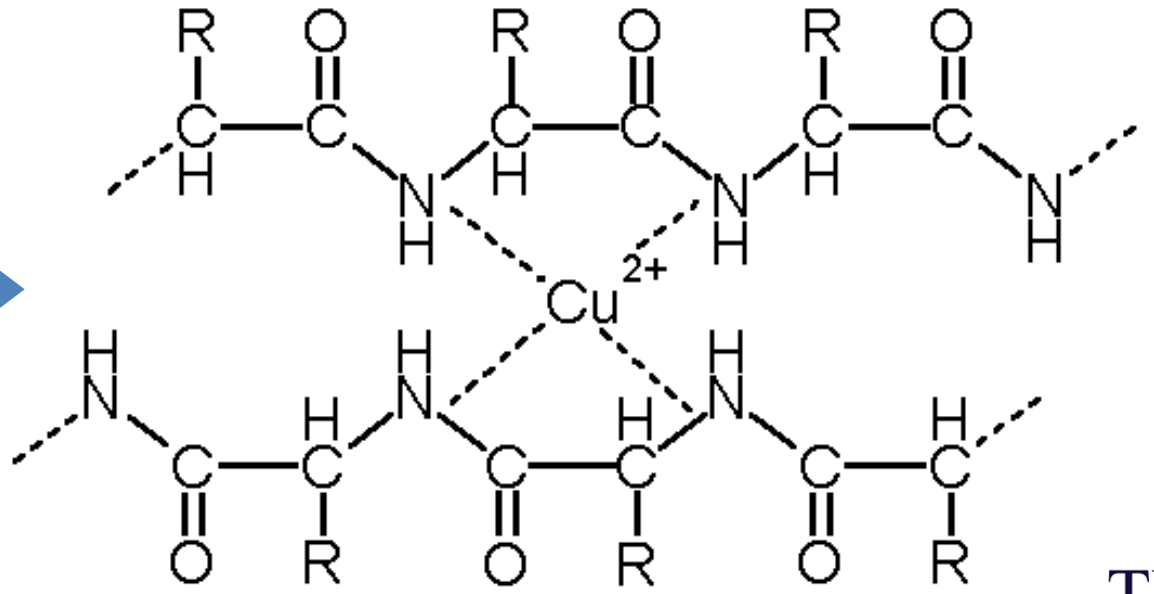
Requisito: al menos dos uniones peptídicas

Reacción de Biuret



Complejo de cobre de Biuret





Reacción de Biuret

Resultado Negativo cuando… :

1. No hay proteínas ni péptidos en la muestra, ni tampoco hay sustancias no proteicas que reaccionen con el reactivo

2. Existen una o más sustancias en la muestra que interfieren con la reacción → ***falso negativo***

   ↳ **Si se está trabajando con péptidos obtenidos por hidrólisis ácida, se debe alcalinizar la muestra**

3. Si la concentración de péptidos se encuentra por debajo del mínimo detectable → ***falso negativo***

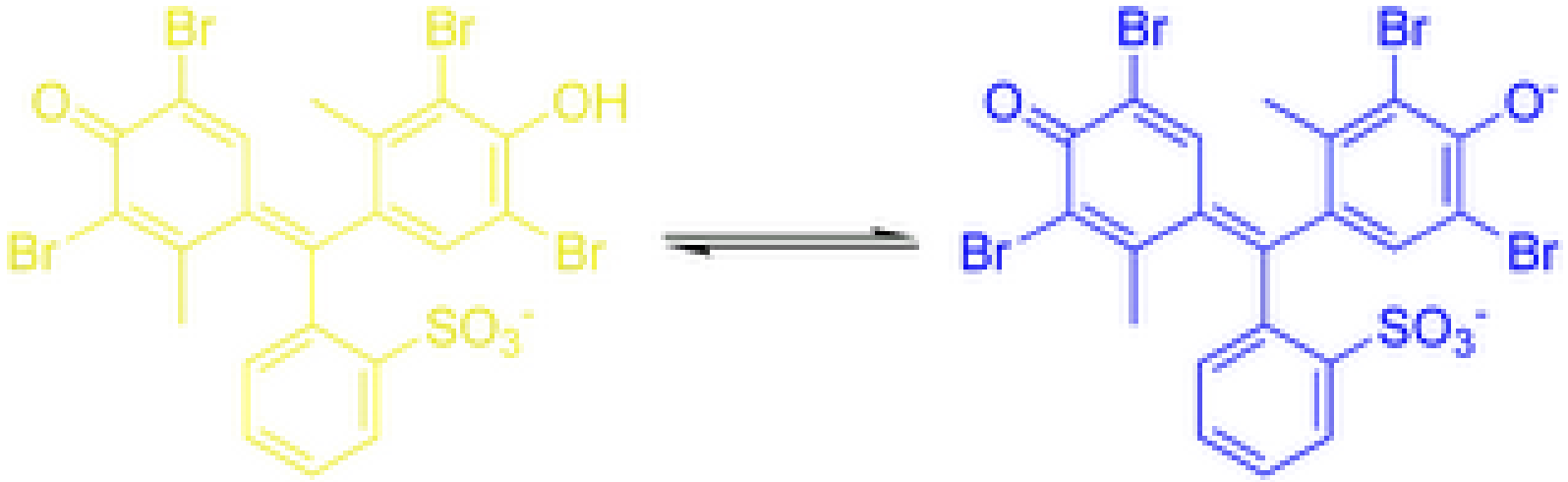
Verde de Bromocresol

Determinación de Albúmina

Verde de bromocresol en medio ácido se disocia y su forma aniónica se une a la albúmina

Amarillo → **Celeste**

La intensidad del color es proporcional a la concentración de albúmina presente en la muestra



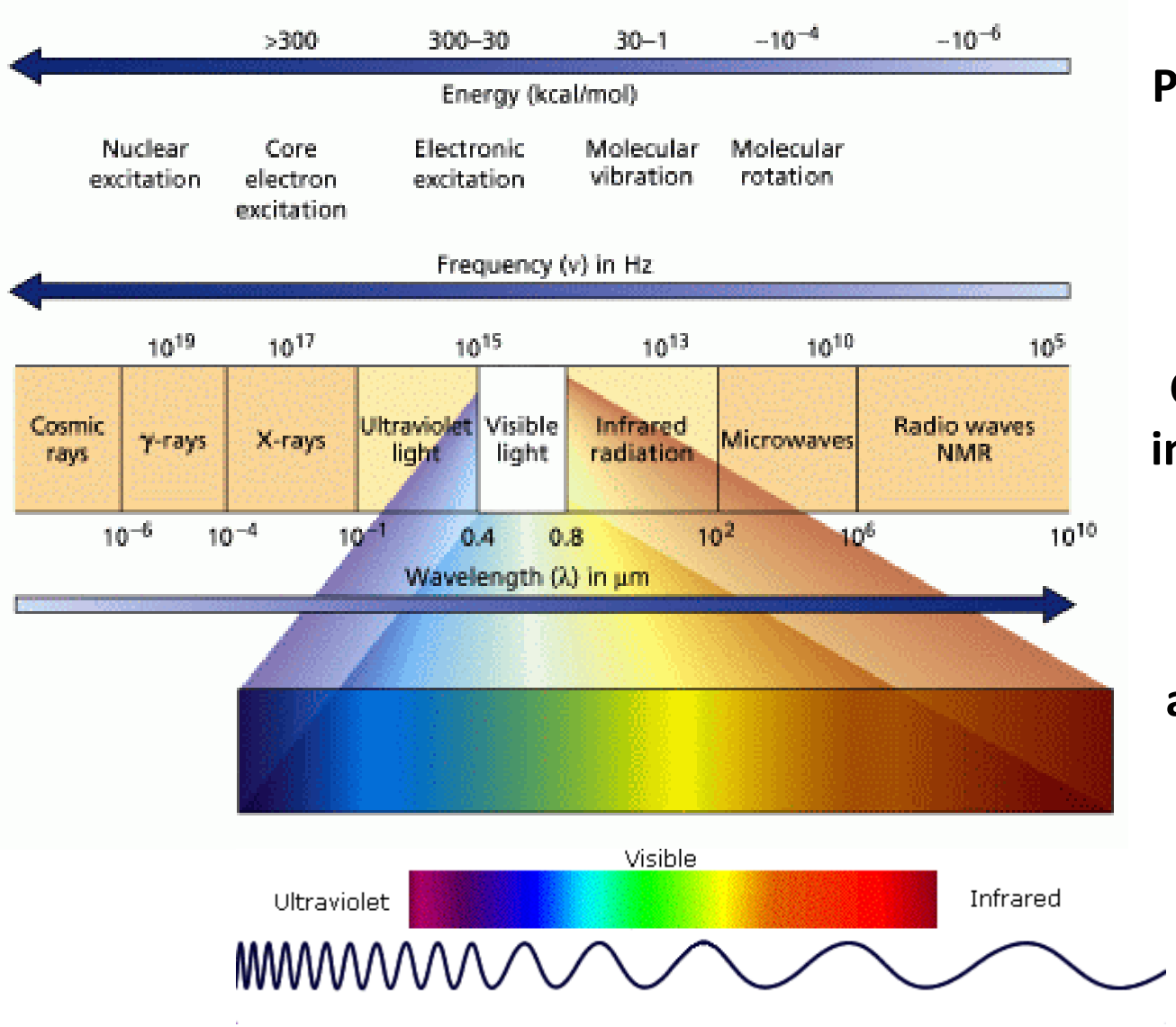
$$HA \xrightarrow{pH\ 3} H^+ + A^-$$

Amarillo

$$Albúmina + H^+ + A^- \xrightarrow{pH\ 3} AlbúminaA^- + H^+$$

Amarillo **Celeste**

Espectrofotometría



Propiedad que tienen varias sustancias de absorber la luz a una determinada longitud de onda (dentro del espectro visible o ultravioleta)

Compara la intensidad de la luz antes de incidir en la sustancia a analizar y después

El cambio que se observa es la absorbancia y ésta se puede utilizar para determinar la concentración de analito, mediante la ley de Beer-Lamber

Espectrofotómetro

Componentes principales

1. Una fuente de luz; la señal depende de la longitud de onda que absorbe la muestra, si es ultravioleta, infrarroja o del espectro visible (espectro visible de va de 380nm a 700nm, menos de 380 nm el ultravioleta y entre 750nm y 2000nm el infrarojo).

2. Un monocromador que selecciona la longitud de onda que incide sobre la muestra.

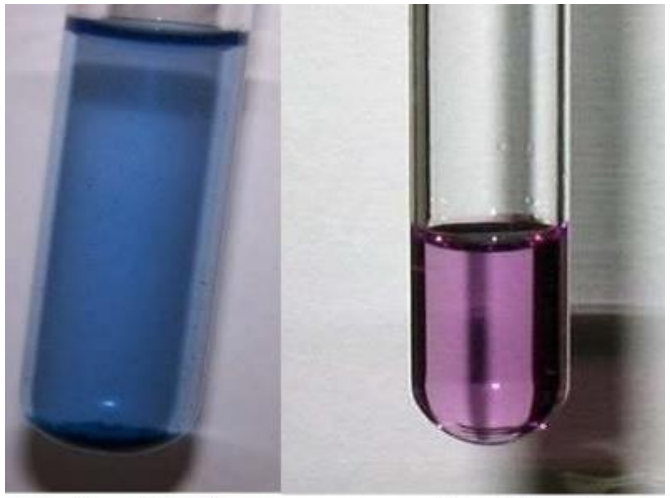
3. Una celda o cubeta donde se encuentra la muestra.

4. Un detector que mide la intensidad de la luz trasmitida (porcentaje de tramitancia, T%) o la que es absorbida (absorbancia).

5. Un sistema de lectura y despliegue de información.

https://www.youtube.com/watch?v=fXjP10sdmQU

https://www.youtube.com/watch?v=tmTqxLLhnWM



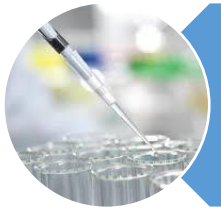
Fundamento

La intensidad de color obtenido en la reacción de Biuret es proporcional a la cantidad de enlaces peptídicos, y para medir esto se utiliza la espectrofotometría.

La espectrofotometría se basa en la propiedad de las sustancias de absorber la luz a una determinada longitud de onda

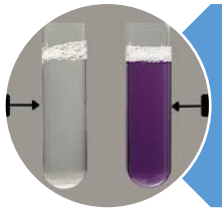
PROCEDIMIENTO PRUEBA DE BIURET (CUALITATIVA)

Rotular 1 tubo para globulina y otro para albúmina.



2. Añadir 0,5 ml de la solución correspondiente.

3. Agregarle 2 ml de reactivo de biuret.

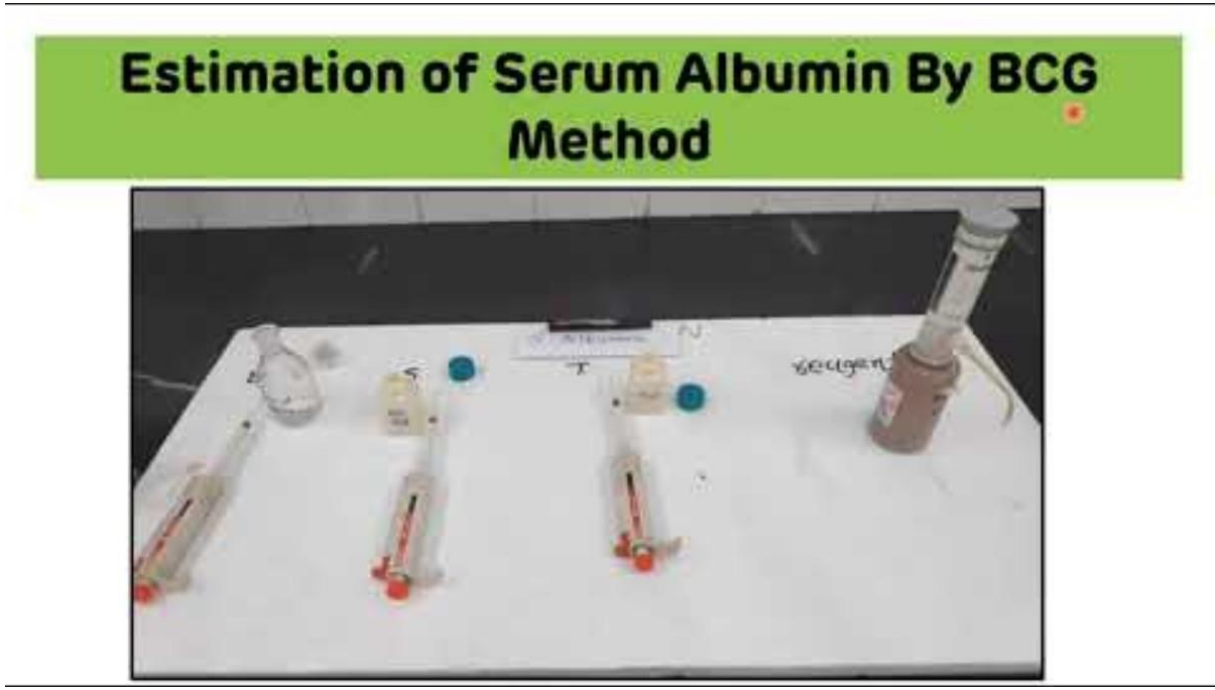


4. Observar cambio de color.

DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA CON VERDE DE BROMOCRESOL (VBC)

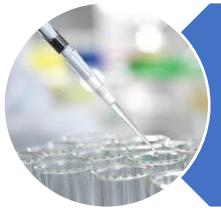
- La prueba de VBC es específica para la determinación de albúmina.

- El reactivo se encuentra en medio ácido, lo que provoca que se disocie y su forma aniónica se une a la albúmina, produciendo un cambio de color de amarillo a celeste. La intensidad del color es proporcional a la concentración de albúmina en la muestra



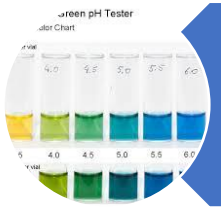
PROCEDIMIENTO DETERMINACIÓN DE ALBÚMINA CON VBC (CUALITATIVA)

Rotular 1 tubo para globulina y otro para albúmina.



2. Añadir 0,5 ml de la solución correspondiente.

3. Agregarle 2 ml de reactivo de VBC.



4. Observar cambio de color.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS (CUALITATIVO)

- Rotular 4 tubos como “patrón”, “blanco”, “muestra”.
- Llenar los tubos de acuerdo al siguiente cuadro:

	BLANCO DE REACTIVO	PATRÓN	MUESTRA	BLANCO DE MUESTRA
Reactivo Biuret	1,0 ml	1,0 ml	1,0 ml	
Agua	10 µL			
Patrón (8g/dl)		10 µL		
Muestra			10 µL	10 µL
Solución salina				1,0 ml

Absorbancia final de la muestra = Absorbancia de muestra - Blanco de muestra

Concentración de proteínas totales = $\frac{\textit{Abs final de la muestra}}{\textit{Abs final del patrón}}$ X Concentración del patrón

Cálculos

Se utilizará el X-ma 1200 spectrophotometer de Human corporation